# CRISPR 系统用于昆虫基因表达调控的研究进展与展望

刘素宁, 李 胜, 任充华*

(华南师范大学生命科学学院, 昆虫科学与技术研究所, 广州 510631)

**摘要**: 昆虫基因功能研究因缺少相应的工具而受到明显限制,但 CRISPR/Cas9 系统的出现为昆虫基因编辑及转录调控研究提供巨大助力。将 Cas9 核酸酶的 RuvC 和 HNH 剪切结构域失活改造得到的 dCas9 系统近年来在基因转录调控方面得到了广泛应用,同时 CRISPR/dCpf1 和最新发现的 CRISPR/Cas13(a/b)系统为基因功能研究提供更多选择。本文综述了 dCas9, dCpf1 及 Cas13(a/b)系统作用机理及在果蝇中的转录调控研究进展,以期为相关昆虫研究提供参考。

**关键词**: CRISPR; 导向 RNA; dCas9; dCpf1; Cas13(a/b); 转录调控

**中图分类号**: Q963 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2018)12-1481-07

## Progress and prospects of CRISPR system in the regulation of gene expression in insects

LIU Su-Ning, LI Sheng, REN Chong-Hua* (Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract**: The study of gene function in insects is restricted by lacking of relevant tools. However, the emergence of CRISPR/Cas9 system provides great help for the research of gene editing and transcriptional regulation in insects. dCas9 with catalytically dead mutant RuvC and HNH domains of Cas9 has been widely used in the transcriptional regulation of genes in recent years. Meanwhile, CRISPR/dCpf1 and the newly discovered CRISPR/Cas13(a/b) systems provide more options for gene function research. In this article, the mechanism of dCas9, dCpf1 and Cas13(a/b) systems and the progress of their application in the transcriptional regulation in *Drosophila* were systematically overviewed, aiming to provide a reference for future related studies of insects.

**Key words**: CRISPR; guide RNA; dCas9; dCpf1; Cas13(a/b); transcriptional regulation

昆虫作为地球上数量最多的动物群体,影响着农业生产、植物保护、疾病传播等众多与人类息息相关的领域,因此了解昆虫基因功能对于益虫利用和害虫防治非常重要。截止 2017 年底,NCBI 已经上传的昆虫基因组数据库达到 266 个,仅次于植物的 295 个,几乎覆盖昆虫所有的目,这为昆虫基因功能研究提供了重要的基因组信息。RNA 干扰技术在昆虫基因功能研究中的应用,为害虫防治提供了巨大帮助(Perkin *et al*., 2016)。即使纳米材料与 dsRNA 的结合使用可将干扰效率明显提高(He *et al*., 2013),但是易脱靶和效率低等缺点仍严重限制该技术在许多昆虫如家蚕 *Bombyx mori* 等中的发挥。基因组编辑技术的兴起与发展对研究昆虫基因功能起到至关重要的作用(Segal and Meckler, 2013),昆虫中最早的基因组编辑策略是通过对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 转座子(P elements)的使用得以实现,通过将线性模板以同源重组的方式插入到果蝇的相应染色体当中,从而制作大量的

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31702055, 31702054)

作者简介: 刘素宁, 男, 1987 年 4 月生, 河北邢台人, 博士后, 主要从事昆虫遗传学及变态发育研究, E-mail: liusuning@m.scnu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: renchonghua111@m.scnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-04-19; 接受日期 Accepted: 2018-08-02

转基因果蝇品系(Majumdar and Rio, 2015),这为果蝇遗传学与基因组学的发展提供巨大助力。锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)(Bibikova *et al*., 2002)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)(Liu *et al*., 2012)以及利用细菌适应性免疫系统改造开发出的 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins)基因组技术可以通过在基因组的特定位点引入双链断裂缺口(double-strand breaks, DSBs)的方式来实现基因敲除(knockout)或外源基因的敲入(knockin),从而实现基因的高效精确编辑。这些技术几乎可以适用于所有生物,引起所有生物学者的高度关注(Harrison *et al*., 2014)。特别是 CRISPR/Cas 系统仅依赖结构简单且易合成的导向 RNA(guide RNA, gRNA)以及细菌自身的核酸酶就能发挥基因编辑功能,其简便性、实用性、通用性使 CRISPR/Cas 系统迅速超越 ZFNs 和 TALENs,成为当下应用最广泛的基因组编辑技术。

CRISPR/Cas 系统不仅可以直接用于基因组 DNA 的编辑来破坏基因的表达,而且其核酸酶活性突变的 CRISPR/dCas (dead Cas protein)可以与转录调控因子共同作用调控基因的表达,可以使用 CRISPRi (CRISPR interference)抑制基因的转录,也可使用 CRISPRa (CRISPR activation)激活基因的转录(Lo and Qi, 2017),并已成为研究许多动物基因功能常用且经典的方法。随着 CRISPR/Cas 家族中 CRISPR/Cpf1 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats from *Prevotella* and *Francisella* 1)以及 CRISPR/Cas13 (a/b)的发现,越来越多的 CRISPR/Cas 系统被用于基因转录调控,既包括基因组水平上的转录起始或延伸调控又包括转录后的 RNA 编辑(Mahas *et al*., 2018)。传统的转录抑制主要采用 RNA 干扰的方式来实现,包括小干扰 RNA (siRNAs)、短发夹 RNA(shRNA)以及昆虫中常用的双链 RNA(dsRNA)等,但是这种方法存在干扰效率不稳定、脱靶率高、无法同时对多个基因进行干扰等缺点(Jackson *et al*., 2003);而传统的提高基因转录或表达的方式则大多采用转染 cDNA 文库基因过表达载体的方式来实现,而该方法则无法科学衡量自身基因组中内源基因表达水平提高对细胞或机体产生的影响(Gurevich and Gurevich, 2015)。

针对上述传统基因表达调控策略的局限性,本文将重点论述 CRISPR/Cas 家族在昆虫基因表达调控上的应用性,包括 CRISPR/dCas (deadCas9, dCas9 及 deadCpf1, dCpf1)介导的 CRISPRi 和 CRISPRa 以及 CRISPR/Cas13(a/b)对 RNA 的直接干扰与调控。

## 1 CRISPR/Cas9 概述

酿脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* 来源的 Cas9 (CRISPR associated protein 9)是最广泛应用于基因编辑的 Cas 蛋白,它只需要与两种小 RNA(一个成熟的 crRNA 和一种反式 tracrRNA)形成复合物就可以实现特异序列 DNA 的剪切(Jinek *et al*., 2012)。随后该技术被加以改造将 crRNA 和 tracrRNA 的表达融合到一起成为一个单链导向 RNA(single guide RNA, gRNA),使其可以由一个启动子控制而在真核细胞中表达,该 gRNA 与 Cas9 蛋白复合物被迅速应用到对多个物种的基因组编辑研究中,目前已成功对人、动物、植物及昆虫等数百个物种成功进行了编辑(Wang *et al*., 2016)。CRISPR/Cas9 系统对 DNA 的识别需要借助 protospacer adjacent motif (PAM)序列来完成,且识别序列长 20 nt 左右,可针对不同位点进行灵活改变。CRISPR/Cas9 切割 DNA 产生 DSBs 后会通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)引起插入或缺失突变(insertion and deletions, Indels),从而改变靶标基因的开放阅读框,引起基因敲除;也可以通过同源介导的修复(homology-directed repair, HDR)方式插入外源序列或基因,引起基因敲入;除以上两种修复方式之外,微同源序列介导的末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)和同源序列介导的末端连接(homology-mediated end joining, HMEJ)也被人们发现可高效用于基因修复及编辑(Truong *et al*., 2013; Yao *et al*., 2017)。最早应用 Cas9 技术的昆虫也是模式动物黑腹果蝇,Gratz 等(2013)利用 Cas9 技术首次完成果蝇 y 基因的敲除。随后该技术呈井喷式发展,应用于近 30 种昆虫的基因研究中,并在多种非模式昆虫中建立了系统的基因敲除方法,对于昆虫基因功能研究帮助巨大,详细应用见已有综述报道(Sun *et al*., 2017)。

## 2 dCas9 概述及修饰后的转录调控机理

CRISPR/Cas9 系统的核酸酶剪切活性由两个切割功能域 RuvC 和 HNH 来实现(Gasiunas *et al*.,

2012)，这两个功能域分别切割 DNA 双链的一条链来使基因组 DNA 产生 DSBs，然后通过细胞内相应的修复机制来引起碱基的插入或缺失，从而达到基因组编辑的目的(Ran *et al*., 2013)。酿脓链球菌来源 spCas9 是目前最常使用的编辑系统，其 RuvC (D10A)以和 HNH(H840A)的同时突变将使 Cas9 核酸酶失去切割活性，成为 dCas9，但是 gRNA 介导的 DNA 结合能力不受影响(Mali *et al*., 2013; Qi *et al*., 2013)(图 1)。

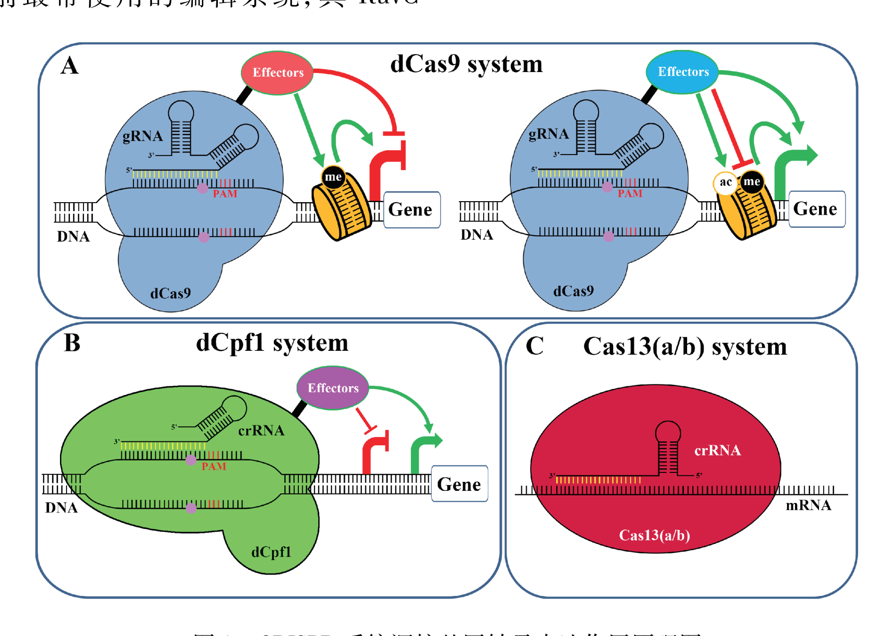



图 1　CRISPR 系统调控基因转录表达作用原理图

Fig. 1　Schematic of the gene transcriptional regulation mediated by CRISPR system

A：CRISPR/dCas9 系统调控基因转录作用原理图，CRISPR/dCas9 系统可以通过促进 DNA 甲基化或改变染色体构象来抑制目的基因的表达(左)，也可以通过抑制 DNA 甲基化、促进组蛋白乙酰化及改变染色体构象来促进基因的表达(右)。Schematic of the gene transcriptional regulation mediated by CRISPR/dCas9. The CRISPR/dCas9 system can inhibit the expression of the target gene by promoting DNA methylation or changing the chromosomal conformation (left), and by reducing DNA methylation, histone acetylation or changing the chromosome conformation (right). B：CRISPR/dCpf1 系统调控基因转录原理图，与 dCas9 系统作用原理相同，dCpf1 蛋白可以与转录调控元件结合达到抑制和促进基因表达的目的。Schematic of the gene transcriptional regulation mediated by CRISPR/dCpf1. The dCpf1 protein works like dCas9 which can promote or inhibit target gene expression by combining with transcriptional regulatory factors. C：CRISPR/Cas13 (a/b)系统通过直接对 mRNA 进行编辑来降低基因的表达水平。CRISPR/Cas13(a/b) system reduces the target gene expression by editing mRNA directly.

受人工锌指转录因子调控基因表达应用的启发(Sera, 2009)，人们希望利用 CRISPR/dCas9 的 DNA 结合特性来调控基因转录表达，包括基因的转录抑制和转录激活。在 CRISPRi 方面，CRISPR/dCas9 自身即可在一定程度上起到抑制基因转录的功能，其主要依靠 dCas9/gRNA 复合物在基因组 DNA 上的占位作用，阻碍转录起始或延伸，使得基因转录表达水平降低，该方法在原核细胞细菌中的效率可达 99.9% (Qi *et al*., 2013)，但是在真核细胞中的效率最高只能达到 60% ~80% (Gilbert *et al*., 2013)，可能的原因为 dCas9/gRNA 无法高效阻止 RNAP (RNA polymerase)复合物在真核细胞中的功能。为了提高抑制效果，人们将 dCas9 与转录抑制或表观调控因子融合来增强转录抑制水平，如 KRAB (Krüppel-associated box) (Gilbert *et al*., 2013, 2014), DNMT3A (Liu *et al*., 2016), LSD1 (Kearns *et al*., 2015), FOG1 (O'Geen *et al*., 2017)等(图 1：A)。而在 CRISPRa 应用方面，dCas9 可以与转录激活因子或表观调控因子融合表达来提高基因的转录水平，如 VP16 及相应多串联拷贝 VP16s 模块(Cheng *et al*., 2013), P300 (Hilton *et al*., 2015)和 TET1 (Amabile *et al*., 2016)等。除上述调控因子，昆虫自身一些蛋白如 Centrosomal 190 kD protein (CP190)，与 dCas9 融合后结合靶向 DNA，通过招募组蛋白乙酰转移酶 Gcn5 等来改变靶向 DNA 上组蛋白乙酰化水平，进而调控基因转录(Ali *et al*., 2017)(图 1：B)。

为了提高转录调控的效果，目前比较常用的优化方法包括：(1)靶向结合位点的筛选：一般在转录起始位点(transcriptional start site, TSS)上游 -50 ~

300 bp 区域效果最佳(Gilbert *et al*., 2014);(2)多位点同时靶向调控:采用同时表达多个 gRNA 的方式来实现(Cheng *et al*., 2013);(3)多个调控因子的结合使用:如 VPR (Chavez *et al*., 2015)以及 SAM 系统(Konermann *et al*., 2015)等。上述转录调控的机制研究主要在哺乳动物细胞中完成。

## 3 CRISPR/dCas9 在果蝇中的应用

果蝇作为昆虫中的模式物种,是新技术在昆虫中应用的首选。但是果蝇中转基因品系构建技术成熟,研究编码基因功能的方法包括 RNAi 或 Cas9 介导的基因敲除都效率很高,因此 dCas9 在果蝇编码基因转录抑制方面的应用目前还未见报道。借助于高通量测序技术的发展与普及,昆虫非编码 RNA 的鉴定与研究工作也进入黄金阶段(Montalbano *et al*., 2017)。长非编码 RNA(LncRNA)作为非编码 RNA 的重要成员,可以通过转录依赖或非依赖方式调控基因表达(Long *et al*., 2017)。目前研究 LncRNA 的策略主要是通过过表达、敲除、RNAi 和反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO)处理等来实现,但是这些策略均有很明显的缺点,不能有效揭示 LncRNA 的功能(Ghosh *et al*., 2016)。CRISPRi 系统为 LncRNA 研究提供可能,dCas9 融合转录抑制因子 KRAB 已被证明可以有效降低人细胞中 LncRNA 转录水平(Gilbert *et al*., 2014),研究人员通过在果蝇细胞和虫体中引入 dCas9-KRAB 系统,可以有效抑制 LncRNA roX 的转录,并发现 dCas9 蛋白经人密码子优化与果蝇密码子优化后的抑制转录效果相近(Ghosh *et al*., 2016)。相对于 Cas9 在果蝇 LncRNA 研究中的应用(Wen *et al*., 2016),虽然 dCas9 避免了切割 DNA 对周围编码基因转录的影响,但 dCas9 的 DNA 占位作用仍可能对周围的编码基因产生影响。

结合 Gal4-UAS 系统构建基因过表达品系,可以在果蝇虫体内实现功能获得(gain-of-function),但无法模拟内源基因转录水平上调对虫体的影响。由 dCas9 融合高效转录激活因子复合物构建的 dCas9-VPR 系统可以靶向上调内源基因的表达。dCas9-VPR 系统首先在果蝇细胞中有效上调了包括 *wingless* 在内的多个基因的转录水平,且人密码子优化的 dCas9-VPR 效果更佳(Lin *et al*., 2015)。研究发现,单一 gRNA 足以保证内源基因的激活,但是 gRNA 需靶向内源基因转录起始位点的上游(Lin *et al*., 2015)。dCas9-VPR 系统引起转录激活也为寻找转录因子下游靶标基因提供实用工具,与转录组高通量测序相结合,研究人员在果蝇细胞中试验了 Snail 和 Twist 两个转录因子,鉴定出大量下游假定靶标(Lin *et al*., 2015)。随后研究人员首次进行了 dCas9-VPR 系统在果蝇虫体中的实验,结合 Gal4-UAS 系统制作出了体内整合表达 dCas9-VPR 和 gRNA 的转基因品系,实验结果与前人研究中直接过表达该基因的表型一致,首次证明了 dCas9-VPR 在昆虫活体中可以使用(Lin *et al*., 2015)。果蝇虫体功能丧失(loss-of-function)研究可以利用现有大量 dsRNA 品系资源来实现,而用于功能获得研究依赖自身基因内源上调的果蝇品系资源却根本不存在。Norbert Perrimon 团队在成功验证了 dCas9-VPR 在果蝇中可行后,他们发起了基于 CRISPRa 系统的果蝇内源基因激活项目,通过构建大量 gRNA 和 dCas9-VPR 品系为果蝇功能获得研究提供资源(Ewen-Campen *et al*., 2017)。

dCas9 融合表观调控因子亦可调控靶标基因转录。Rainer Renkawitz 团队在研究启动子结合因子 CP190 时发现,CP190 可以招募组蛋白乙酰转移酶 Gcn5 参与染色质构象改变;Gcn5 通过组蛋白乙酰化激活内源基因转录,研究人员发现 dCas9 系统融合 CP190 或 Gcn5 都可以激活 *eve* 基因的表达(Ali *et al*., 2017),这一结果为 dCas9 融合表观调控因子调控基因表达提供了新的思路和方向。

dCas9 系统除了可以直接参与转录调控,研究人员根据其精确结合靶向 DNA 的特性在果蝇中开发出染色质纯化技术 CLASP(Cas9 locus-associated proteome),可以帮助实现基因表达调节因子的鉴定(Tsui *et al*., 2018),这为基因表达调控的分子机理研究提供了强有力的分子工具。

## 4 CRISPR/dCpf1 和 CRISPR/Cas13(a/b)的作用机理及应用前景

CRISPR/Cpf1 是一种 RNA 导向的 Ⅱ - Ⅴ 型 CRISPR/Cas 系统,是继 CRISPR/Cas9 后应用最广泛的系统,与 CRISPR/Cas9 系统相比,(1)Cpf1 蛋白更小;(2)导向 RNA 结构更简单,只由 crRNA 组成(3)识别 DNA 所需的 PAM 序列不同;(4)切割 DNA 产生粘性末端(Zetsche *et al*., 2015)。Cpf1 切割 DNA 同样由 RuvC 以及 HNH 功能域来完成,因此该系统与 Cas9 系统类似,可以通过将这两个功能域失

活使其变成 dCpf1 用于基因转录调控研究，CRISPR/dCpf1 在基因表达调控中的应用可直接参考 CRISPR/dCas9 系统的工作原理，只需将 dCas9 系统中融合的转录调控因子与 dCpf1 蛋白进行融合即可应用于内源基因的转录调控（图 1：B）。目前该系统也已在植物及哺乳动物细胞中得到验证与应用（Kim *et al.*, 2017; Liu Y *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017a, 2017b），但在昆虫中的应用还未见报道。

除了直接结合 DNA 的 dCas9 及 dCpf1 系统可以用于调控基因的转录水平之外，可直接靶向并编辑 RNA 的 CRISPR/Cas13 系统亦可用于基因的表达调控。研究人员最早于 2015 年通过生物信息分析的方法发现了该类与 Cas9 和 Cpf1 具有一些相同特征的核酸酶并命名为 C2c2（Cas13a）（Shmakov *et al.*, 2015）。Feng Zhang 研究组以及 Jennifer A. Doudna 研究组都解析并验证了 C2c2 的 RNA 降解原理及活性（Abudayyeh *et al.*, 2016; East-Seletsky *et al.*, 2016），后续研究对 Cas13a/b 的结构与工作机理又进行了进一步解析（Knott *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017a, 2017b; Smargon *et al.*, 2017）。早期的研究主要是在体外或细菌里面完成，真正将 Cas13 系统应用于哺乳动物细胞 RNA 调控的报道出现于 2017 年，Feng Zhang 研究组不仅证实 Ⅱ – Ⅵ 型 Cas13a 系统可用于 RNA 干扰（Abudayyeh *et al.*, 2017），还发现其同源蛋白 Cas13b 可在在具有 RNA 干扰能力的同时可对 RNA 进行编辑（Cox *et al.*, 2017）（图 1：C）。Cas13 系统与 dCas9 及 dCpf1 的作用机理完全不同，dCas9 及 dCpf1 是通过作用于基因组 DNA 来发挥作用，而 Cas13 系统则是通过直接作用于 RNA 来进行转录后的调控，Cas13 系统在昆虫中的应用目前亦未见报道。

## 5　小结与展望

目前 CRISPR 系统已经发展成为一种最常见的基因调控手段，包括基因的敲除、敲低（knockdown）和激活（activation）。与传统的利用 shRNA, siRNA, dsRNA 等方法进行基因干扰相比，CRISPR 系统介导的 CRISPRi 脱靶率更低特异性更高，且可以同时对多个基因进行调控（Jackson *et al.*, 2003）；CRISPR 系统还可以直接激活内源基因的表达，避免了外源 cDNA 表达载体的引入；而且，与基于 zinc fingers 和 TALE 两种 DNA 结合蛋白的转录调控系统相比，CRISPR 系统的构建更加便捷高效，且调控效率更佳；CRISPR 系统除了可以靶向 RNA 外还可以靶向编码序列和调控元件，包括启动子、增强子等，且随着更多 CRISPR 家族成员被发现，该系统在基因表达调控中的应用会更加广泛。

虽然新 CRISPR 系统如 dCas9, dCpf1 以及 dCas13（a/b）在基因表达调控方面有着诸多优势且已得到的广泛应用，但是该系统在昆虫中的应用寥寥无几，且已有的几篇报道也主要集中在模式昆虫果蝇上，并未在昆虫基因功能研究中得到充分的利用。鉴于 CRISPR 系统的诸多优点，其将在编码基因和非编码基因转录调控方面大有作为。本文通过对现有 CRISPR 系统的基因调控原理及应用现状进行系统论述，将为接下来该系统在昆虫中的应用指明方向。

**参考文献（References）**


Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F, 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675): 280 – 284.

Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F, 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299): aaf5573.

Ali T, Kruger M, Bhuju S, Jarek M, Bartkuhn M, Renkawitz R, 2017. Chromatin binding of Gcn5 in *Drosophila* is largely mediated by CP190. *Nucleic Acids Res.*, 45(5): 2384 – 2395.

Amabile A, Migliara A, Capasso P, Biffi M, Cittaro D, Naldini L, Lombardo A, 2016. Inheritable silencing of endogenous genes by hit-and-run targeted epigenetic editing. *Cell*, 167(1): 219 – 232.

Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D, 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3): 1169 – 1175.

Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, Lin S, Kiani S, Guzman CD, Wiegand DJ, Ter-Ovanesyan D, Braff JL, Davidsohn N, Housden BE, Perrimon N, Weiss R, Aach J, Collins JJ, Church GM, 2015. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods*, 12(4): 326 – 328.

Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, Rangarajan S, Shivalila CS, Dadon DB, Jaenisch R, 2013. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.*, 23(10): 1163 – 1171.

Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F, 2017. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358(6366): 1019 – 1027.

East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JH, Tjian

R, Doudna JA, 2016. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 538(7624): 270–273.

Ewen-Campen B, Yang-Zhou D, Fernandes VR, Gonzalez DP, Liu LP, Tao R, Ren X, Sun J, Hu Y, Zirin J, Mohr SE, Ni JQ, Perrimon N, 2017. Optimized strategy for *in vivo* Cas9-activation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(35): 9409–9414.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V, 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(39): E2579–E2586.

Ghosh S, Tibbit C, Liu JL, 2016. Effective knockdown of *Drosophila* long non-coding RNAs by CRISPR interference. *Nucleic Acids Res.*, 44(9): e84.

Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS, 2014. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 159(3): 647–661.

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS, 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2): 442–451.

Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O′Connor-Giles KM, 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4): 1029–1035.

Gurevich VV, Gurevich EV, 2015. Analyzing the roles of multi-functional proteins in cells: the case of arrestins and GRKs. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 50(5): 440–452.

Harrison MM, Jenkins BV, O′Connor-Giles KM, Wildonger J, 2014. A CRISPR view of development. *Genes Dev.*, 28(17): 1859–1872.

He B, Chu Y, Yin M, Mullen K, An C, Shen J, 2013. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Adv. Mater.*, 25(33): 4580–4584.

Hilton IB, D′Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA, 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotech.*, 33(5): 510–517.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS, 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotech.*, 21(6): 635–637.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096): 816–821.

Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, Maehr R, 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods*, 12(5): 401–403.

Kim SK, Kim H, Ahn WC, Park KH, Woo EJ, Lee DH, Lee SG, 2017. Efficient transcriptional gene repression by type V-A CRISPR-Cpf1 from *Eubacterium eligens*. *ACS Synth. Biol.*, 6(7): 1273–1282.

Knott GJ, East-Seletsky A, Cofsky JC, Holton JM, Charles E, O′Connell MR, Doudna JA, 2017. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 24(10): 825–833.

Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F, 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536): 583–588.

Lin S, Ewen-Campen B, Ni X, Housden BE, Perrimon N, 2015. *In vivo* transcriptional activation using CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 201(2): 433–442.

Liu J, Li C, Yu Z, Huang P, Wu H, Wei C, Zhu N, Shen Y, Chen Y, Zhang B, 2012. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J. Genet. Genomics*, 39(5): 209–215.

Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y, 2017a. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 170(4): 714–726.

Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, Li J, Sheng G, Wang Y, 2017b. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities. *Cell*, 168(1–2): 121–134.

Liu XS, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S, Shu J, Dadon D, Young RA, Jaenisch R, 2016. Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell*, 167(1): 233–247.

Liu Y, Han J, Chen Z, Wu H, Dong H, Nie G, 2017. Engineering cell signaling using tunable CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nat. Commun.*, 8(1): 2095–2095.

Lo A, Qi L, 2017. Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR-Cas systems. *F1000Res.*, 6: 747.

Long Y, Wang X, Youmans DT, Cech TR, 2017. How do lncRNAs regulate transcription? *Sci. Adv.*, 3(9): eaao2110.

Mahas A, Stewart CNJr, Mahfouz MM, 2018. Harnessing CRISPR/Cas systems for programmable transcriptional and post-transcriptional regulation. *Biotechnol. Adv.*, 36(1): 295–310.

Majumdar S, Rio DC, 2015. P transposable elements in *Drosophila* and other eukaryotic organisms. *Microbiol. Spectr.*, 3(2): MDNA3-0004-2014.

Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM, 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotech.*, 31(9): 833–838.

Montalbano A, Canver MC, Sanjana NE, 2017. High-throughput approaches to pinpoint function within the noncoding genome. *Mol. Cell*, 68(1): 44–59.

O′Geen H, Ren C, Nicolet CM, Perez AA, Halmai J, Le VM, Mackay JP, Farnham PJ, Segal DJ, 2017. dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression. *Nucleic Acids Res.*, 45(17): 9901–9916.

Perkin LC, Adrianos SL, Oppert B, 2016. Gene disruption technologies

have the potential to transform stored product insect pest control. *Insects*, 7(3): E46.

Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA, 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5): 1173-1183.

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F, 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6): 1380-1389.

Segal DJ, Meckler JF, 2013. Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 14: 135-158.

Sera T, 2009. Zinc-finger-based artificial transcription factors and their applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(7-8): 513-526.

Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV, 2015. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell*, 60(3): 385-397.

Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F, 2017. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol. Cell*, 65(4): 618-630.

Sun D, Guo Z, Liu Y, Zhang Y, 2017. Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Front. Physiol.*, 8: 608.

Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q, Kirkland ER, Zhang Y, Qi Y, 2017. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat. Plants*, 3: 17018.

Truong LN, Li Y, Shi LZ, Hwang PY, He J, Wang H, Razavian N, Berns MW, Wu X, 2013. Microhomology-mediated end joining and homologous recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(19): 7720-7725.

Tsui C, Inouye C, Levy M, Lu A, Florens L, Washburn MP, Tjian R, 2018. dCas9-targeted locus-specific protein isolation method identifies histone gene regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115(12): 2734-2741.

Wang H, La Russa M, Qi LS, 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.*, 85: 227-264.

Wen K, Yang L, Xiong T, Di C, Ma D, Wu M, Xue Z, Zhang X, Long L, Zhang W, Zhang J, Bi X, Dai J, Zhang Q, Lu ZJ, Gao G, 2016. Critical roles of long noncoding RNAs in *Drosophila* spermatogenesis. *Genome Res.*, 26(9): 1233-1244.

Yao X, Wang X, Hu X, Liu Z, Liu J, Zhou H, Shen X, Wei Y, Huang Z, Ying W, Wang Y, Nie YH, Zhang CC, Li S, Cheng L, Wang Q, Wu Y, Huang P, Sun Q, Shi L, Yang H, 2017. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.*, 27(6): 801-814.

Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F, 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3): 759-771.

Zhang X, Wang J, Cheng Q, Zheng X, Zhao G, Wang J, 2017a. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell Discov.*, 3: 17018.

Zhang X, Wang W, Shan L, Han L, Ma S, Zhang Y, Hao B, Lin Y, Rong Z, 2017b. Gene activation in human cells using CRISPR/Cpf1-p300 and CRISPR/Cpf1-SunTag systems. *Protein Cell*, 4: 380-383.

（责任编辑：马丽萍）